

III. MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel tanah diambil dari Hutan Larangan Adat Rumbio Kabupaten Kampar. Sedangkan Enumerasi dan Analisis bakteri dilakukan di Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi (PEM) Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2015 hingga Februari 2015.

3.2 Bahan dan Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari timbangan digital, kantong plastik, petridis, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikroskop, jarum *Ose*, bunsen, pipet volume, labu Erlenmeyer, pipet mikro, *autoklaf*, oven, dan batang kaca penyebar, gelas beaker, ph meter, *vortex*, cawan petri, *hot plate*, inkubator, kaca objek, *laminar air flow*, shaker, dan alat *Bor* tanah. Bahan yang digunakan yaitu sampel tanah, NaCl fisiologis 85%, bahan pewarnaan gram bakteri, alkohol, aquades, kapas, *aluminium foil* dan media *Nutrient Agar* (NA).

3.3 Metode Penelitian

Dalam penelitian ini sampel yang diambil ialah tanah Hutan Larangan Adat Kampar yang diambil secara *purposive sampling*. Metode yang digunakan pada penelitian ini merupakan jenis metode observasi, yaitu dengan mengambil sampel tanah di Hutan Larangan Adat Rumbio. Kemudian menghitung jumlah koloni bakteri dan menganalisis bakteri yang didapat secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis (tanpa menggunakan mikroskop atau kasat mata) yang dilakukan meliputi bentuk koloni dilihat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping, tepi koloni dilihat dari atas, warna koloni, diameter bakteri, sedangkan secara mikroskopis (tidak kasat mata) adalah pengamatan yang dilakukan dengan menggunakan bantuan mikroskop yaitu melihat warna sel bakteri dan bentuk sel bakteri.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara *purposive sampling* (penentuan titik sampel) yaitu sampel yang akan diambil ditentukan terlebih dahulu. Sampel diambil sebanyak 9 titik secara zig-zag (Husen, 2007). Sampel tanah Top Soil yang diambil dengan kedalaman, 0-10 cm, 11-20 cm dan 21-30 cm. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan *bor* tanah dengan kedalaman tanah 0-10 cm, 11-20 cm dan 21-30 cm. Kemudian setelah sampel diambil menggunakan *bor* tanah sampel tanah dimasukkan kedalam plastik klip dan diberi label berdasarkan kedalaman masing-masing simpan sampel di dalam termos yang berisi es batu. Sampel yang telah dipindahkan dalam termos kemudian ditutup rapat dan dibawa ke laboratorium.

3.4.2 Pembuatan Media NA

Preparasi pembuatan media NA: 1) Pada penelitian ini media NA yang digunakan merupakan media instan yang telah jadi dalam bentuk *powder*, rimbang media sebanyak 28 g/L aquadest menggunakan timbangan analitik. 2) Setelah itu media dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambah aquadest steril kemudian homogenkan dengan menggunakan *hot plate* dan *Magnetic stirrer*, setelah media tercampur dengan rata beri penutup kapas dan aluminium foil pada mulut erlenmeyer. 3) Media yang telah homogen tersebut kemudian disterilkan kedalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. 4) tuang media steril ke dalam cawan petri steril secara aseptik di dalam laminar air flow, diamkan media sampai media tersebut memadat dan dingin. Media siap digunakan.

3.4.3 Isolasi Bakteri

Tanah yang sudah dicampurkan dengan NaCl 0,85% pada seri pengenceran 10^4 - 10^7 diteteskan pada media padat *Nutrient Agar* (NA) dalam cawan petri sebanyak 0,5 ml kemudian diratakan menggunakan batang penyebar. Setiap pengenceran diulang dua kali. Inkubasi cawan petri dalam posisi terbalik selama 24-48 jam dengan suhu 37°C.

3.4.4 Pemurnian Biakan Murni

Isolat bakteri yang didapat harus dimurnikan untuk mendapatkan biakan murni karena koloni yang tumbuh dalam cawan petri masih terdapat beberapa koloni. Pemurnian bakteri tanah gambut dilakukan dengan cara penggoresan agar menggunakan teknik goresan sinambung. Jarum ose yang telah dipijarkan hingga merah dan kemudian didinginkan, digunakan untuk mengambil koloni bakteri dalam cawan petri. Jarum ose yang telah digunakan untuk mengambil bakteri digoreskan setengah di lempengan agar, kemudian putar lempengan 180° goreskan kembali pada permukaan lempengan agar yang tersisa (Waluyo, 2008).

3.4.5 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yakni, bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri yang digunakan yaitu bakteri yang berumur kurang dari 24 jam. Prosedur kerja dari pewarnaan Gram ini yaitu bersihkan preparat glass dengan alkohol 70% kemudian di fiksasi di atas bunsen, beri label pada bagian bawah preparat glass, pijarkan jarum ose kemudian dicelupkan ke aquades dan teteskan 1 ose aquades pada preparat glass menggunakan jarum ose, pijarkan lagi jarum ose dan diambil bakteri dari media dengan cara aseptik lalu diratakan di atas preparat glass, keringkan teteskan larutan zat warna methylen blue sebanyak 1 atau 2 tetes keringkan selama 30 detik, cuci dengan aquades, keringkan preparat dengan dianginkan, kemudian teteskan 1 atau 2 tetes larutan lugol selama 1 menit kemudian bilas dengan alkohol 70% dan di cuci dengan aquades, terakhir tetes larutan Safranin sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik kemudian bilas dengan aquades kembali dikeringkan dan diamkan terakhir amati dibawah mikroskop.

3.4.6 Pengukuran pH Tanah

Prosedur kerja dalam analisis pH tanah adalah sebagai berikut : timbang 10 g tanah, setelah ditimbang masukkan kedalam labu erlenmeyer kemudian ditambah dengan air aquades sebanyak 50 ml (pH H₂O). Kemudian tanah yang sudah dicampur dengan air aquades dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 30 menit. Setelah *dishaker* selama 30 menit kemudian tanah diukur dengan



menggunakan pH meter selama 5 menit dengan 3 kali pengulangan maka setelah melakukan pengulangan sebanyak 3 kali pH yang di dapat dibagi menjadi tiga sehingga didapat pH sebenarnya.

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Pengamatan Jumlah Sel Bakteri

Pada penelitian ini parameter pengamatan yang diukur adalah pH tanah, jumlah koloni, morfologi koloni, pewarnaan Gram, dan bentuk sel berdasarkan kedalaman tanah, 0-10 cm, 11-20 cm, dan 21-30 cm. Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni adalah metode cawan hitung. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan petri yang mengandung koloni antara 30-300. Jika tidak ada, pilihan atau lebih dari 300 maka dipilih yang mendekati 300. Prinsip dari metode ini adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan dalam media, maka mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung, dan kemudian dihitung menggunakan alat *Colony counter*. Rumus menghitung jumlah koloni adalah sebagai berikut (Omar *et al.*, 1996) :

$$\text{Jumlah koloni/ml} = \frac{1}{\text{vol. sampel}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \text{jumlah koloni dalam cawan}$$

3.5.2 Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri

Berdasarkan Utomo (2008) pengamatan bakteri dilakukan dua tahap pengamatan yaitu, pengamatan makroskopis dan miroskopis. Pengamatan makroskopis adalah pengamatan bakteri berdasarkan sifat-sifat morfologinya dan diameternya. Hal-hal yang diamati, yaitu warna koloni (putih, putih susu, krem muda, krem tua, putih kekuningan, kuning, orange), bentuk koloni (bulat, dan tidak teratur), permukaan koloni (timbul datar, membukit, dan serupa akar), tepi koloni (keriting, utuh) dan diameter koloni.

3.5.3 Pengamatan Mikroskopis Koloni Bakteri

Pengamatan mikroskopis adalah pengamatan bakteri di bawah mikroskop untuk melihat pewarnaan gram positif dan negatif (warna dan bentuk sel).



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

3.6 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dari hasil data lapangan dan hasil data laboratorium disajikan dalam bentuk tabel. Analisis data ini menggunakan rumus jumlah koloni dengan menggunakan microsoft excel sehingga didapat jumlah populasi sampel dalam setiap kedalaman.

